

Rec'd PCT/PTO 19 JAN 2005

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年7月24日 (24.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/059366 A1(51) 国際特許分類⁷: A61K 35/64, 7/50, A61P 29/00,
37/08, A61K 9/08, 31/575 // C07J 9/00

[JP/JP]: 〒102-8275 東京都 千代田区 九段南四丁目8番24号 学校法人 日本大学内 Tokyo (JP). 望月 征四郎 (MOCHIZUKI,Seishiro) [JP/JP]; 〒102-8275 東京都 千代田区 九段南四丁目8番24号 学校法人 日本大学内 Tokyo (JP). 岸田 宏隆 (KISHIDA,Hirotaka) [JP/JP]; 〒102-8275 東京都 千代田区 九段南四丁目8番24号 学校法人 日本大学内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/00287

(22) 国際出願日: 2003年1月15日 (15.01.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(74) 代理人: 浅村 皓, 外(ASAMURA,Kiyoshi et al.); 〒100-0004 東京都 千代田区 大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo (JP).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-8022 2002年1月16日 (16.01.2002) JP
特願2002-381414 2002年12月27日 (27.12.2002) JP

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 学校法人日本大学 (NIHON UNIVERSITY SCHOOL JURIDICAL PERSON) [JP/JP]; 〒102-8275 東京都 千代田区 九段南四丁目8番24号 Tokyo (JP).

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 秋久 俊博 (AKI-HISA,Toshihiro) [JP/JP]; 〒102-8275 東京都 千代田区 九段南四丁目8番24号 学校法人 日本大学内 Tokyo (JP). 石川 稔矩 (ISHIKAWA,Toshinori) [JP/JP]; 〒102-8275 東京都 千代田区 九段南四丁目8番24号 学校法人 日本大学内 Tokyo (JP). 鈴木 良弘 (SUZUKI,Yoshihiro)

(54) Title: SKIN PERPARATION FOR EXTERNAL USE CONTAINING PURPURICENUS TEMMINCKII FRASS AS THE ACTIVE INGREDIENT

(54) 発明の名称: ベニカミキリフラスを有効成分とする皮膚外用薬

(57) Abstract: It is intended to provide an antiallergic agent, a skin preparation for external use, a dermatitis preventive, an agent for relieving hay fever and a bathing preparation which originate in a natural substance and are efficacious as antipruritic against various skin itches and usable in preventing and treating atopic dermatitis and allergic symptoms. Namely, an antiallergic agent, a skin preparation for external use, a dermatitis preventive, an agent for relieving hay fever and a bathing preparation characterized by containing as the active ingredient *Purpuricenus temminckii* frass.

(57) 要約:

本発明は、皮膚に感ずる種々の痒みに対して有効な、天然物由来のかゆみ止め、アトピー性皮膚炎やアレルギー性症状の予防及び治療となる抗アレルギー剤、皮膚外用剤、皮膚炎抑制剤、花粉症軽減剤及び浴用剤の提供を目的とする。

本発明は、ベニカミキリフラスを成分として含有することを特徴とする抗アレルギー剤、皮膚外用薬、皮膚炎抑制剤、花粉症軽減薬及び浴用剤に関する。



添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

ベニカミキリフラスを有効成分とする皮膚外用薬

5 技術分野

本発明は、ベニカミキリフラスを有効成分とする皮膚外用薬などの薬剤に関するものである。

背景技術

人が生命体を維持して、活動を行っていく上で、体表面の皮膚に感ずる痒みとは、皮膚や粘膜の痛点が弱い刺激によって生じる感覚、搔痒感のことである。

近年、生活環境の変化に伴いアトピー性皮膚炎の発症が激増している。アトピー性皮膚炎の発症には環境要因が大きく作用するといわれている。環境要因には、非アレルギー的要因とアレルギー的要因に分けられる。非アレルギー的要因には、皮膚の乾燥、発汗、皮膚の加圧・加重、皮膚の搔破等によるものである。アレルギー的要因では、食物アレルゲンの吸引によるもの、だに、ハウスペスト、花粉、金属等との接触などによるものである。

非アレルギー要因による場合には、要因と接触することで、痒みが生じ、その痒みに対して皮膚を搔くことにより皮膚組織が破壊され、皮膚が有する防御機能が損なわれ、皮膚過敏や病原菌による感染症状が引き起こされる。

アレルギー症状は、体内で起こる抗原抗体反応による免疫グロブリンE（IgE）の産生により、結果的に肥満細胞の細胞膜を刺激し、ヒスタミン、ロイコトリエン、セロトニンなどの活性物質を放出することにより起こる。放出されたこれらの物質は、血管透過性を促進させる作用や、平滑筋を収縮させる作用があるため、白血球や蛋白質を血管から漏出させたり、炎症により気管支を収縮させ、喘息を引き起こす原因となる。また、体内にアレルゲンが侵入するとT細胞が感作され、再度アレルゲンに接触するとリンホカインと呼ばれる炎症性因子を放出し、反応を起こす。このような症状に対して、予防・改善に有効な因子を探し出す研究が行われている。

そして、抗アレルギー成分に関し、ボルネオールの肥満細胞膜安定可能を利用

するもの（特開平6－211713号公報）、放線菌培養液による炎症抑制作用を利用するもの（特開平5－25053号公報）などが知られている。また、ごま油を摂取することによって、アレルギー反応の原因となるロイコトリエンの産生を抑制する効果が知られている（Prostaglandin、第36巻、第3号、1985年）。また、ドコサヘキサエン酸（DHA）、或いはリノレン酸を含む油脂の抗アレルギー性を利用するもの（特開平2－29081号公報）が知られている。これらの天然に存在する抗アレルギー剤は副作用が少ないが、抗アレルギー症状の予防及び治療には、その効果は、十分ではない。

ヒスタミンを代表とする多数の活性物質が肥満細胞や好塩基球から遊離されることが影響を与えていていることから、前記の抗アレルギー症状を軽減させるために、ヒスタミン受容体阻害剤が有効と考えられ、クロラルフェニルアミン、ジフェンヒドラミンなどの抗ヒスタミン剤や副腎皮質ホルモンが用いられるが、これらの薬剤を用いる場合には、副作用を伴うことが問題とされている。

このようなことから、副作用が少ない薬剤の開発が進められており、天然物由来の物質の開発が進められている。

この種の天然物としてはキク科ヒマワリ属の花弁抽出物を用いるもの（特開2000－351723号公報）、アカナノキなどの抽出物（特開2000－26307号公報）、ティートリーの抽出物（特開平11－255661号公報）、トコフェロール抽出物（特開2001－163764号公報）、キトサンを用いるもの（特開2001－55335号公報）などが開発されている。

発明の開示

本発明の課題は、皮膚に感ずる種々の痒み防止及び改善に対して有効な、天然物由来のかゆみ止め、アトピー性皮膚炎やアレルギー性症状の予防、改善及び治療となる、抗アレルギー剤、皮膚外用剤、皮膚炎抑制剤及び浴用剤を提供することである。

本発明者らは、前記課題を解決すべく銳意研究し、竹類に寄生するベニカミキリの幼虫の排泄物であるベニカミキリフラスの成分を含む組成物、ベニカミキリフラスを水或いは有機溶媒で処理して得られる抽出物を用いて、ヒスタミン遊離抑制試験及びロイコトリエン分泌抑制試験を行ったところ、高活性を示し、アレ

ルギー性の皮膚炎、アトピー性皮膚炎などのアレルギー性症状に有効に作用することを見出し、さらに、実際にヒスタミンが関与するアレルギー性の皮膚炎、アトピー性皮膚炎やアレルギー性症状、花粉症状軽減薬、虫さされ、環境要因による皮膚そう痒症等に用いて試したところ、広範囲にわたる痒み症状に対して短時間で顕著な効果が見られ、各種の痒みの内服薬及び外用薬として予防及び改善に有効であること、更に機能性食品として用いると、痒みの予防・改善に有効であること、更にこれらを浴用剤として用いると、痒みの予防・改善にも有効であることを見出して、本発明を完成させた。

すなわち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

- 10 (1) ベニカミキリフラスを成分として含有することを特徴とする抗アレルギー剤。
(2) ベニカミキリフラスを成分として含有することを特徴とする皮膚外用薬。
(3) ベニカミキリフラスを成分として含有することを特徴とする皮膚炎抑制剤。
15 (4) ベニカミキリフラスを成分として含有することを特徴とする浴用剤。
(5) ベニカミキリフラスを成分として含有することを特徴とする花粉症軽減剤。

図面の簡単な説明

図1は、ベニカミキリフラス水抽出物のヒスタミン遊離抑制試験の結果を示す
20 図である。

図2は、ベニカミキリフラス水抽出物のロイコトリエン分泌抑制試験の結果を示す図である。

図3は、年齢及び性別による患者の分布の状態を示す図である。

図4は、痒みに対する改善の効果が現れるまでの時間を示す図である。

25 図5は、痒みの原因となる症状の分布を示す図である。

図6は、ベニカミキリフラスの抽出物分画スキームを示す図である。

図7は、ベニカミキリフラスのn-ヘキサン抽出物によるβ-ヘキソサミニダーゼ遊離測定法の結果を示す図である。

図8は、ベニカミキリフラスの水抽出物によるβ-ヘキソサミニダーゼ遊離測

定法の結果を示す図である。

図9は、ベニカミキリフラス水抽出物の24穴マルチウェル・スクリーニング法によるギムザ染色の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- 5 本発明の対象であるベニカミキリフラス成分を取得するために用いられる原料の竹としては、モウソウチク属、シホウチク属、マダケ属、シュドササ属、ササモルファ属、ナリヒラタケ属、トウチク属などの竹類が用いられる。なかでも、マダケ属の孟宗竹及びハチクが好適に用いられる。これらの竹が切り取られ、放置されると、ベニカミキリ (*Purpuricenus temminckii* Guerin-Meneville1844) 10 が卵をうみつけ、その幼虫が竹類を食べて成長する。その成長過程で、排泄物を竹の中に残す。これをベニカミキリフラスと呼ぶ。このベニカミキリフラスを集めて、本発明の抗アレルギー剤などの対象物質とする。

なお、ベニカミキリは、主に我が国では、本州（ヤブツバキ帯—ブナ帯下部）、佐渡、四国、九州、壱岐、対馬などに分布し、春から夏にかけて出現する。

- 15 竹から得られるベニカミキリフラスは、しつとりとした粒状の薄黄色を帯びた組成物として得られる。

このベニカミキリフラスは、水分を含有するので、これを乾燥させることにより水分を取り除いて粉状体とすることができる。乾燥させるには、30～80°C の条件下に行う。80°Cを越える高温で処理すると、分解などを伴うので、好ましくない。

この粉状のものを、ガーゼなどを用いて患部に直接接触させることにより、薬剤として使用することができる。また、このベニカミキリフラスは、格別水分などを取り除くことなく、そのまま薬剤として使用することもできる。後述する実施例で直接用いた結果を示すが、薬剤として良好な結果を示すものである。

- 25 また、水又は有機溶媒により抽出された抽出液の状態のものを、アレルギー症状を緩和させるために、患部に前記と同様に接触させて用いることができるし、水に溶解させたものを、花粉症点鼻薬として粘膜にほどこすことができる。

ベニカミキリフラスより水抽出物を取り出す場合には、過剰量の水（熱水）と容器内で接触させる。水には熱湯を用いることが効果的である。通常、0.00

1～0. 007重量%程度の濃度になるように水量を調節する。抽出には、還流条件下に加熱する。加熱時間は、適宜設定する。加熱処理は、通常少なくとも15分以上、1時間程度は必要である。

その結果、ベニカミキリフラスの有効成分は熱水層に移行させることができる。

5 この熱水処理は2回以上、通常3回程度まで繰り返すことが有効である。

この一回目の操作により、一般には、ベニカミキリフラス重量に対して0. 3～1. 0%程度、通常0. 7重量%程度の割合で液状物が得られる。このようにして得られる液状物を減圧条件下に濃縮する。最終的に、ベニカミキリフラスの抽出物は、茶褐色の粉末状のものとして得られる。収量は、ベニカミキリフラス

10 の重量に対して1. 0～2. 0重量%程度のものが得られる。

温水の利用も可能である。圧力をかけた条件下にも行うことができる。このようにして得られる粉末状の水抽出物を、使用に際しては、適宜水に溶かして薬剤として利用する。

後の実施例に示すように竹フラス10gを用いて水抽出を行った結果、176.

15 2mgのフラス抽出物を得ている。

ベニカミキリフラスを有機溶媒に接触させて処理することにより有機溶媒による抽出物としたものを薬剤として利用することができる。

有機溶媒としては、エタノール、メタノール、イソプロパノールなどのアルコール類、グリセリン、エチレングリコール、プロピレングリコール、1, 3-ブチレングリコールなどの多価アルコール又はその誘導体、アセトン、メチルエチルケトンなどのケトン類、酢酸エチル、酢酸イソプロピルなどのエステル類、エチルエーテル、イソプロピルエーテルなどのエーテル類を挙げることができる。また、石油エーテル、n-ヘキサン、n-ペンタンなどの脂肪族炭化水素なども用いることができる。

25 これらの中では、エタノール、1, 3-ブチレングリコール、プロピレングリコールなどが用いられる。これらには、水を含めて混合溶媒として用いることができる。

いずれも溶媒抽出した後、更に他の溶剤に接触させて、さらに特定の成分を取り出すことができるが、そのような操作を施すことなく、エタノール或いは1,

3—ブチレングリコール溶媒のものを適当な濃度のものとして、患部に直接、塗りつける、或いはガーゼなどにしみこませた状態であてがうことによって、用いることができる。

ベニカミキリフラス成分の有機溶媒抽出に当たっては、ヘキサンなどで抽出を
5 行って、ヘキサン抽出物と残さに分け、この残さをメタノール抽出し、メタノール抽出物と残さに分け、メタノール抽出物を酢酸エチル溶解成分とブタノール溶解成分に分けることができ、残さを水抽出を行うなどして、各種溶解成分を取り出すこともできる。

ベニカミキリフラスの成分を含有する組成物は、抗アレルギー剤として用いる
10 ことができる。抗アレルギー剤としては、経口内服薬、静脈注射、外用薬として利用できる。また、花粉症軽減薬、又、機能性食品や菓子などの食品及び各種飲料中に添加して痒み防止或いは改善をはかることもできる。又、皮膚外用剤、皮膚保護剤、皮膚炎抑制剤、ローション及びクリーム及び石鹼などに添加して、痒み防止・改善をはかる化粧品として利用することもできるし、痒み防止・改善作用も有する頭髪剤にも用いることもできる。また、浴用剤に添加して浴用剤に痒み防止・改善をはかるようにすることもできる。場合によつては、下着や靴下などの衣料に含有させて、衣料に痒み防止・改善の作用をもたせることもできる。

ベニカミキリフラスを、水抽出物、有機溶剤抽出物、或いは乾燥物として0.
001～20重量%程度の濃度のものとして用いることが一般的である。
20 この中に、抗炎症剤、抗アレルギー性疾患剤である、アズレン、塩酸ジフェンヒドラミン、d 1- α トコフェロール及びその誘導体と共に用いることもできる。また、多糖類などの天然高分子、でんぶん、水溶性高分子、アニオン、カチオ

ン、ノニオンなどの界面活性剤を用いることもできる。
入浴剤として用いる場合には、粉状のベニカミキリフラス、炭酸水素ナトリウム、無水硫酸ナトリウム、硼砂、香料、安定剤などとともに混合したものを、水などに溶解抽出物を適宜水に溶かして薬剤として利用する。また、液状のベニカミキリフラスをホホバ油、香油、色素、保湿剤、界面活性剤と混合した液状のもとしても利用することができる。

以下に、本発明の内容を実施例により説明する。

本発明のベニカミキリフラスの抽出物の製造方法として、有機溶媒による抽出物の製造方法及び水による抽出物の製造方法について示す。

本発明のベニカミキリフラスの薬剤として用いた効果については、ヒスタミン遊離抑制及びロイコトリエン分泌抑制試験、 β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制試験を行うことによって、痒みなどに対する効果を確認することができる。

本発明のベニカミキリフラスの各種皮膚疾患に使用する場合の毒性試験として、線維芽細胞を用いる「24穴マルチウェル・スクリーニング法」により行い、その結果から、その毒性の有無を確認することができる。以下に、その内容及び実験結果について詳細に説明する。

10 実施例

以下、実施例により本発明の内容を説明する。

実施例 1

(ベニカミキリフラスの有機溶媒による抽出物の製造)

竹から得られたベニカミキリフラス 591 g を、ヘキサンで抽出を行って、ヘキサン抽出物 332 mg と残さに分け、この残さを、メタノール抽出し、メタノール抽出物 14.6 g と残さに分け、メタノール抽出物が酢酸エチルに溶解した区分 3.685 g と水により溶解した区分に分けることができ、水により溶解した区分について、n-ブタノール溶剤で処理し、ブタノール溶解区分 1.931 g と水区分に分けることができ、メタノール抽出残さを水（熱水）抽出を行って、水抽出物 12.132 g を得た。

実施例 1-2

(ベニカミキリフラスの有機溶媒による抽出物の製造)

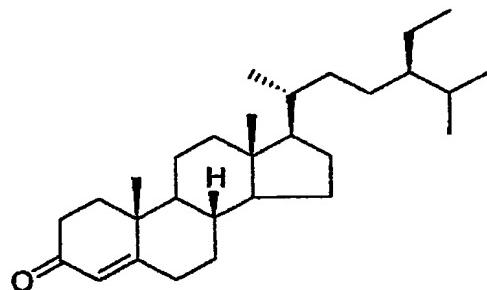
竹から得られたベニカミキリフラス 1037 g を、ヘキサンで抽出を行って、ヘキサン抽出物 509.9 mg と残さに分け、この残さを、メタノール抽出し、メタノール抽出物と残さに分け、メタノール抽出物を酢酸エチル溶解区分 5.41 g 及び水溶解区分にわけることができ、水により溶解した区分について、n-ブタノール溶剤で処理し、ブタノール溶解区分 2.53 g と水区分 3.65 g に分けることができ、メタノール抽出残さを水（熱水）抽出を行って、水抽出物 27.132 g を得た。（図 6）

実施例 1-3

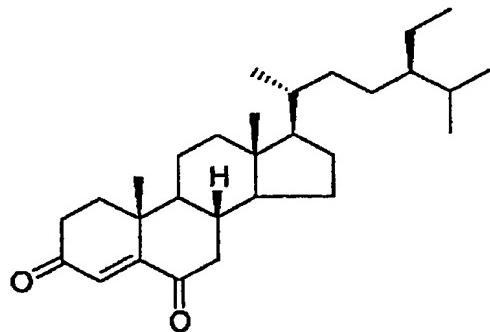
(n-ヘキサン抽出物からの成分の分離)

ベニカミキリフラス (1037 g) を、n-ヘキサン (3 L) で3回、3時間加熱還流抽出し、得られた抽出物 (461 mg) をシリカゲルのカラムクロマトで分画した。得られた3-オキソステロイド画分の薄層クロマトグラフィ及び逆相分取HPLCを行い、3種の化合物を単離した。

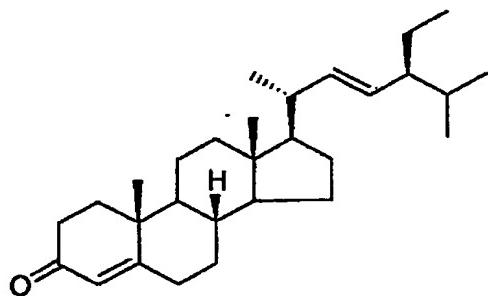
3種の化合物は、スチグマスター-4-エン-3-, 6-ジオン (2.9 mg)、スチグマスター-4, 22-ジエン-3オン (1.0 mg)、及びスチグマスター-4-エン-3-オン (5.9 mg) と同定した。これらの3種の3-オキソステロイドについて、 β -ヘキソサミニダーゼ遊離測定法の試料とした。



スチグマスター-4-エン-3-オン



スチグマスター-4-エン-3,6-ジオン



スチグマスター-4,22-ジエン-3-オン

実施例 2-1

(ベニカミキリフラスの水抽出物の製造)

竹から採取したベニカミキリフラス 10 g を、水 500 mL に溶解させ、加熱
5 し、還流条件下に加熱した。加熱処理は、5 時間行った。

得られたベニカミキリフラスの抽出成分を含有する成分に関し、同様に 2 回操
作を繰り返した。その結果、ベニカミキリフラス水抽出物 176.2 mg を得た。
以後の実施例ではこれを必要量の水に溶解して用いる。

実施例 2-2

10 (β-ヘキソサミニダーゼ遊離測定法に用いたベニカミキリフラスの水抽出液の
製造)

竹から採取したベニカミキリフラス 1037 g に、水 3 L を加え、3 時間加熱
還流を行い、抽出を行った。得られた抽出物の一部 (41.2 mg) を、
Shodexカラム (GS-320HQ) にて 7 区画分に分画した。これら 7 区画分
15 [Fr. 1 (3.2 mg)、Fr 2 (3.2 mg)、Fr 3 (8.2 mg)、
Fr 4 (6.8 mg)、Fr 5 (6.2 mg)、Fr 6 (5.0 mg)、Fr.
7 (5.0 mg)] について、β-ヘキソサミニダーゼ遊離測定法に用いるベニカ
ミキリフラスの水抽出物とした。

実施例 3

20 (ヒスタミン遊離抑制試験)

実施例 2-1 で得られたベニカミキリフラス水抽出液のヒスタミン遊離抑制効
果を、ラット由来好塩基球細胞 (RBL-2H3) から遊離されるヒスタミンを
指標とする抗アレルギー作用試験法を用いて評価した。

RBL-2H3を24穴プレートに 2.5×10^5 細胞／穴となるように細胞を播種し、24時間培養（二酸化炭素5%、37度）後、Phosphate buffer saline (PBS) で1回洗浄した後、各濃度の竹チップ抽出物／20mM Heps-DMEM 180μLを加えて二酸化炭素5%、37度で30分培養し、次に、刺激剤A23187（カルシウムイオノファ）を20μL加えて30分培養した後、上清200μLを取り出した。また、20mM Heps-DMEM (Medium) 及び界面活性剤0.05% Triton X-100（細胞壁を溶解することで細胞中の全ヒスタミン含量を測定する）を用いて上述と同様に刺激して得られた上清を各々Negative Control、Positive Controlとした。

このようにして取り出した上清中のヒスタミン含量はHistamine enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) Kit (ICN Pharmaceuticals社製) を用いて定量した。なお、ヒスタミン遊離率およびコントロールに対するヒスタミン遊離率は式1及び式2を用いて算出した。コントロールに対する各濃度のヒスタミン遊離率を図1に示す。

ヒスタミン遊離率 (%)

$$= ((A - B) / (C - B)) \times 100 \quad \dots \quad (\text{式1})$$

Aはベニカミキリフラス水抽出液処理した細胞にA23187で刺激した上清中のヒスタミン含量
BはNegative Controlによる上清中のヒスタミン含量
CはPositive Controlによる上清中のヒスタミン含量

コントロールに対するヒスタミン遊離率 (%)

$$= (D / E) \times 100 \quad \dots \quad (\text{式2})$$

Dは各濃度のベニカミキリフラス水抽出物のヒスタミン遊離率 (%)
EはA23187刺激のみ（ベニカミキリフラス水抽出物で未処理）のヒスタミン遊離率 (%)

コントロールはA23187で刺激のみ（ベニカミキリフラス水抽出物で未処理）の上清中のヒスタミン遊離率 (%)

(結果)

A 2 3 1 8 7 はブランクの結果である。

0. 6 2 5 m g / m L の場合には、顕著に減少しており、その後、1. 2 5 m g / m L 、1. 2 5 m g / m L 以降徐々に値が減少している。ヒスタミン遊離抑制効果は十分にあることが理解できる。

5 実施例 4

(ロイコトリエン分泌抑制試験)

実施例 2-1 で得たベニカカリキリラス水抽出物のロイコトリエン分泌抑制効果をラット由来好塩基球細胞 (RBL-2H3) から分泌されるロイコトリエンを指標とする抗アレルギー作用試験法を用いて評価した。

10 RBL-2H3 を 24 穴プレートに 2.5×10^5 細胞 / 穴となるように細胞を播種し、24 時間培養 (二酸化炭素 5% 、37 度) 後、Phosphate buffer saline (PBS) で 1 回洗浄した後、各濃度のベニカミキリラス水抽出物 / 20 mM Hepes - DMEM 180 μ L を加えて二酸化炭素 5% 、37 度で 30 分培養し、次に、抗原 20 μ L を加えて刺激し 30 分 15 培養した後、上清 200 μ L を取り出した。

20 このようにして取り出した上清中のロイコトリエン分泌量は Leukotriene C₄ Enzyme immunoassay (EIA) Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) を用いて定量した。なお、ロイコトリエンの分泌量はロイコトリエン標準溶液 (0 ~ 1000 pg / m L) による検量線を用いて算出した。各濃度によるロイコトリエン分泌 25 抑制効果を図 2 に示す。

(結果)

DNP-BSA は、ブランクの結果である。0. 6 2 5 m g / m L 以降、徐々に減少し、5. 0 m g では、45 pg / mL という小さな結果の値を得た。このことから、ベニカミキリラス水抽出物のロイコトリエン分泌抑制効果は、十分 25 に確認することができた。

(β -ヘキソサミニダーゼ測定法)

β -ヘキソサミニダーゼ測定法の測定原理は、以下の通りである。

β -ヘキソサミニダーゼは、糖分解酵素であり、マスト細胞の顆粒中に豊富に存在するリソソーム酵素の一つである。

β -ヘキソサミニダーゼ測定法は、本酵素の存在により、p-ニトロフェノールが分離する。この分離されたp-ニトロフェノールを比色法により測定し(405 nm)、この結果を β -ヘキソサミニダーゼ酵素活性とする。

(結果)

5 NADPH oxidaseの阻害剤であるDPIを用いて、 β -ヘキソサミニダーゼ抑制効果を検討したところ、DPIは抗原刺激により生じた β -ヘキソサミニダーゼを濃度依存的に抑制した。

β -ヘキソサミニダーゼ抑制効果は、ヒスタミン抑制効果と同等の評価が可能であった。

10 (β -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制試験)

β -ヘキソサミニダーゼ遊離測定効果は、ラット由来好塩基球菌(RBL-2H3)から遊離される β -ヘキソサミニダーゼを指標とする抗アレルギー作用試験法を用いて評価することとした。

RBL-2H3を、10%ウシ子牛血清(FCS)100単位/mLペニシリン、100 μg/mLストレプトマイシン含有Minimum Essential Medium Eagleで培養(5%二酸化炭素、37°C)した。次に、細胞培養用24ウェル平底マイクロプレートに、 2×10^5 セル数(500 μL medium/well)づつ播種し、24時間培養(5%二酸化炭素、37°C)することによって、細胞を感作させた。その後、感作した細胞を500 μLのPBFで1回洗浄し、160 μLの5.6 mMグルコース、1 mM塩化カルシウム、0.1%BSA含有siraganian緩衝液を加えた。各濃度のサンプル液、20 μLの被験物質溶液(DMSO:0.1%)を加え、10分後に抗原(DNP-BSA:10 μg/mL)を加えて10分間インキュベートして細胞を刺激した。10分間氷冷して反応を止めた後、上清50 μLを、96ウェル平底マイクロプレートに移し、酵素反応液100 μLを加えて、混和し、マイクロプレートリーダーにて吸光度を測定し、以下の式により遊離率を求めた(測定波長:405 nm、参照波長:655 nm)。

β -ヘキソサミニダーゼ遊離率(%)

= [刺激により遊離した β -ヘキソサミニダーゼ量/

細胞内全 β -ヘキソサミニダーゼ量] × 100

細胞内全 β -ヘキソサミニダーゼの測定には、超音波破碎機で破碎した細胞を遠心分離した上清を用いた。

(ヘキサン抽出物による β -ヘキソサミニダーゼ遊離測定法)

5 実施例1-2のヘキサン抽出物から得られた3種のオキソステロイド(スチグマスト-4-エン-3, 6-ジオン、スチグマスター-4, 22-ジエン-3-オン、及びスチグマスト-4-エン-3-オン)について、 β -ヘキソサミニダーゼ遊離測定効果を測定した。これらについては、一応の β -ヘキソサミニダーゼ遊離測定効果を確認した。結果は、図7の通り。

10 実施例5

(水抽出物による β -ヘキソサミニダーゼ遊離測定法)

実施例2-2で得られたベニカリキリフラスの水抽出物(竹から採取したベニカリキリフラス1037gに、水3Lを加え、3時間加熱還流を行い、抽出を行った。得られた抽出物(41.2mg)の一部を、Shodexカラム(GS-320HQ)により、7区画分に分画した。これら7区画分(Fr. 1~Fr. 7))について、 β -ヘキソサミニダーゼ遊離測定試験を行った。

結果を、(図8)に示した。

全体に一応の活性を見ることができた。Fr. 1及び2については、活性が強いことがわかった。

20 実施例6

(24穴マルチウェル・スクリーニング法(毒性試験))

24穴マルチウェル・スクリーニング法(高岡聰子著「組織培養入門」学会出版センター発行68頁)により、本発明のベニカリキリフラスの薬剤の毒性試験を行った。

25 (この方法は、ABCD各ライン(行)及び1から6列のウェル(合計24穴)を用意し、Aラインについて薬剤原液0.1mLを含む(A1)、及び濃度が倍々に希釈され、濃度が相違する((A2~A5)、薬剤を含まない(A6)を用意する。次に、細胞の浮遊液を調製する。細胞数は、 $5 \times 10^4 / mL$ 程度である。各ウェルに細胞浮遊液を0.9mLずつ分注する。これを水平にしたま

ま、左右に軽く揺すって、炭酸ガスふらん器で培養。3～7日培養し、培地をすて、メタノールを静かに注入し、10分以上固定。流水で洗った後、ギムザ染色を行い、染色異常が見られるかどうかで毒性を判定するものである。)

毒性試験の内容は、以下の通りであった。

5 (1) 薬剤抽出液の作成

ベニカミキリフラス水抽出物（ベニカミキリフラス3.9gに、20mLの純水を添加して攪拌し、室温から100℃直前（沸騰直前）まで加熱し、この温度において煮出した状態として、1時間保ち、室温まで冷却し、遠心分離器により（1200 rpm. 10分間）、遠心分離を行った。上澄の清浄液を濾過滅菌し、

10 薬剤原液を作成した。

(2) 毒性試験として、前記24穴マルチウェル・スクリーニング法を行った。

(3) 使用細胞は、以下の細胞を使用した。

NHDF-NEO CRYOPRESERVED（ヒト皮膚線芽細胞 新生児）である。BIO WHITTAKER (ACAMBREX COMPANY

15 製製造年月日：1999年5月10日 Lot番号：9F0889 保証書添付のもの)

(4) 培養培地は、以下の培地を使用した。

F BM (改変 MCD B 202 血清添加)

(5) 添加条件は以下の通りであった。

20 原液のマルチウェルへの添加は、1ウェルあたり、0.1mLであった。

希釈は、PBS（リン酸緩衝塩類溶液）により、最終濃度を、0%、12.5%、25%、50%の4段階とした。

(6) 培養条件

培地F BMに浮遊した細胞液0.9mLを、各24ウェルに添加した。36℃で4日間、加温した。

(7) 鑑定法

(イ) ウェル内の培地を捨て（細胞は、ウェルに接地）、直ちに、メタノールで固定後、ギムザ染色を行った。顕微鏡により観察し、写真記録を行った（図9）。

(ロ) 25cm²のプラスチック培養瓶で原液50%を添加し、8日間観察した。

また、培養後、ギムザ染色を行った。

(8) 鑑定結果

(イ) 以上の操作により得られた、24穴マルチウェル・スクリーニング法による対照結果(図9)によれば、対照結果(0%)と前記最終濃度0%、12.5%、25%、50%の結果と比較して、最終濃度0%、12.5%、25%、50%のいずれも、増殖及び形態に変化はなく、毒性がないことがわかった。

(ロ) 25cm²のプラスチック培養瓶で原液50%を添加し、8日間観察した結果では、増殖及び形態共に影響は見られなかった。

培養後、ギムザ染色を行った結果によれば、異常はなかった。

10 (9) 結論

ベニカミキリフラスの水抽出液は、ヒト由来線維芽細胞に影響を与えることなく、薬剤として使用した場合に安全であると言うことができる。

実施例7

15 ベニカミキリフラスの水抽出物を精製水に溶解し、0.005%濃度として、かゆみを呈する際に隨時患部に塗布させ、かゆみ症状の改善状況について表1に示す結果を得た。なお、本剤使用期間中は抗ヒスタミン剤など別の抗アレルギー剤の使用は中止させた。

本発明による皮膚外用剤を塗布した症例1～11(皮膚搔痒症、アトピー性皮膚炎、水虫、あせも、蕁麻疹、虫刺され、血液人工透析、かぶれ、刺青、しもやけ、とびひ)の結果は、これら全ての症状によるかゆみに本剤が極めて有効であることを示しており、止痒効果の無い例及び塗布により症状(かゆみ及び皮膚炎など)の悪化した例は一件も認められなかった。

その結果を整理して表に整理したものが、表1である。

表 1

皮膚外用剤塗布による止痒効果

症例	かゆみ症例	対象症例数	顕著	やや有効	無効	悪化
1	皮膚搔痒症	12	8	4	0	0
2	アトピー性皮膚炎	8	7	1	0	0
3	水虫	5	5	0	0	0
4	あせも	3	3	0	0	0
5	蕁麻疹	2	1	1	0	0
6	虫刺され	2	2	0	0	0
7	血液人工透析	1	1	0	0	0
8	かぶれ	1	1	0	0	0
9	刺青	1	1	0	0	0
10	しもやけ	1	1	0	0	0
11	とびひ	1	1	0	0	0

(結果)

以上の表の記載から明らかなように、顕著に効いたものが多く、そして、有効が若干有り、全体として顕著に効いたということができる。無効及び悪化というものは皆無であった。そして、各種の原因による痒みに有効であることが理解できる。

本調査結果について、集計方法の整理して見ると以下のことがわかる。

男女の割合は、各々 50% であり、同じである。年齢及び性別による患者の分布の状態は、図 3 に示すとおりである。ベニカミキリフラスの使用に関しては、水抽出物 (90%)、粉末 (3%) 及びその両方を併用したもの (7%) であった。

効果が現れる迄の時間は、殆ど 1 分から 5 分の間にあり、痒みに対して即効性があることがわかる (図 4)。痒い症状の原因の分布は、図 5 に示すとおりである。この結果から、広範囲の症状に有効であることが理解できる。

実施例 8

ベニカミキリフラス 100 g を水 1 L により添加し、加熱し、煮沸した状態で 3 時間保持した。得られた抽出液を冷却して、水抽出液を得た。これを点鼻注入器により、10 日間にわたり、1 日 3 回、花粉症の患者 20 人に注入した。

花粉症の軽減が 14 人に見られ、そのうち 5 人には著効があった。

以下に、処方例の一例を示す。本発明はこれに限定されるものではないことは言うまでもない。

ローション状痒み防止・軽減剤

	エタノール	15.0 (重量%)
5	ヒドロキシエチルセルロース	0.1
	パラオキシ安息香酸メチル	0.1
	ベニカミキリフラス水抽出物	0.2
	精製水	84.6
	乳状痒み防止・軽減剤	
10	ステアリン酸	0.2 (重量%)
	セタノール	1.5
	ワセリン	3.0
	流動パラフイン	7.0
	ポリオキシエチレン (10E.O)	
15	モノオレイン酸エステル	1.5
	酢酸トコフェロール	0.2
	グリセリン	5.0
	パラオキシ安息香酸メチル	0.1
	トリエタノールアミン	0.1
20	ベニカイキリ水抽出物	0.4
	精製水	81.0
	ゲル状痒み防止・軽減剤	
	ジプロピレングリコール	10.0 (重量%)
	カルボキシビニルポリマー	0.5
25	水酸化カリウム	0.1
	パラオキシ安息香酸メチル	0.1
	ベニカミキリ水抽出物	0.5
	精製水	88.8
	クリーム状痒み・軽減防止剤	

	みつろう	6. 0 (重量%)
	セタノール	5. 0
	還元ラノリン	8. 0
	スクワレン	27. 5
5	グリセル脂肪酸エステル	4. 0
	親油性グリセルモノステアリン酸エステル	2. 0
	ポリオキシエチレン (20E. O) ソルビタン モノラウリル酸エステル	5. 0
	プロピレングリコール	5. 0
10	パラオキシ安息香メチル	0. 1
	ベニカミキリフラス水抽出物	0. 5
	精製水	36. 9
	散剤状痒み軽減防止剤	
	ケイ酸アルミン酸マグネシウム	95. 3 (重量%)
15	カルボキシメチルセルロースカルシウム	4. 5
	ベニカミキリフラス乾燥粉末	0. 2
	浴用剤	
	炭酸水素ナトリウム	63. 0 (重量%)
	無水硫酸ナトリウム	30. 0
20	硼砂	2. 0
	ベニカミキリフラス乾燥粉末	5. 0
	浴用剤	
	精製ホホバ油	5. 0 (重量%)
	ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート	20. 0
25	グリセリンモノラウレート	5. 0
	流動パラフィン	2. 0
	ラウリン酸ジエタノールアミド	2. 0
	ベニカミキリフラス水抽出物	3. 0
	精製水	67. 0

産業上の利用の可能性

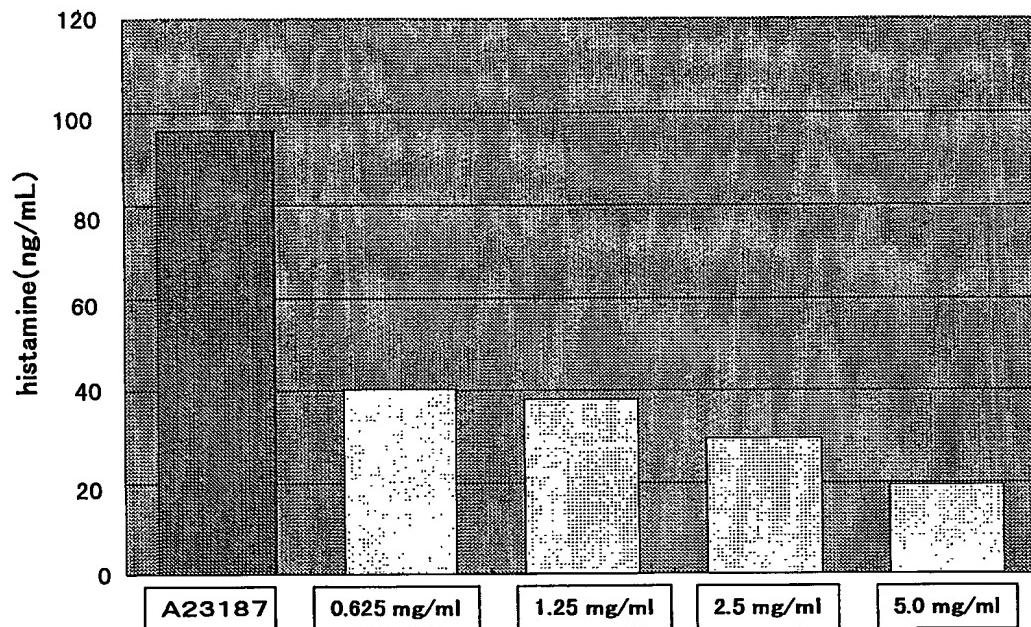
本発明によるベニカミキリフラスを成分として含有する皮膚外用剤、皮膚炎抑制剤、及び入浴剤は、皮膚に感ずる各種の痒み、アレルギー性の皮膚炎、アトピー性皮膚炎やアレルギー性症状、虫さされ、皮膚そう痒症の予防及び治療薬として有用である。

請求の範囲

1. ベニカミキリフラスを成分として含有することを特徴とする抗アレルギー剤。
- 5 2. ベニカミキリフラスを成分として含有することを特徴とする皮膚外用薬。
3. ベニカミキリフラスを成分として含有することを特徴とする皮膚炎抑制剤。
4. ベニカミキリフラスを成分として含有することを特徴とする浴用剤。
5. ベニカミキリフラスを成分として含有することを特徴とする花粉症軽減剤。

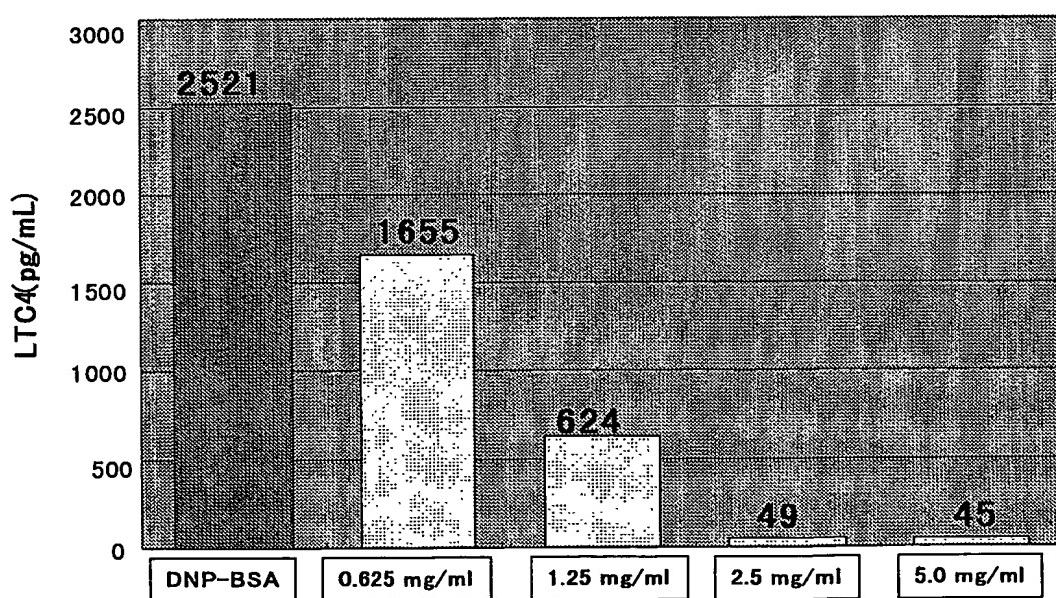
1/8

FIG. 1



ベニカミキリフラス水抽出物のヒスタミン遊離抑制効果

FIG. 2



ベニカミキリフラス水抽出物のロイコトリエン分泌抑制効果

FIG. 3

年齢・性別

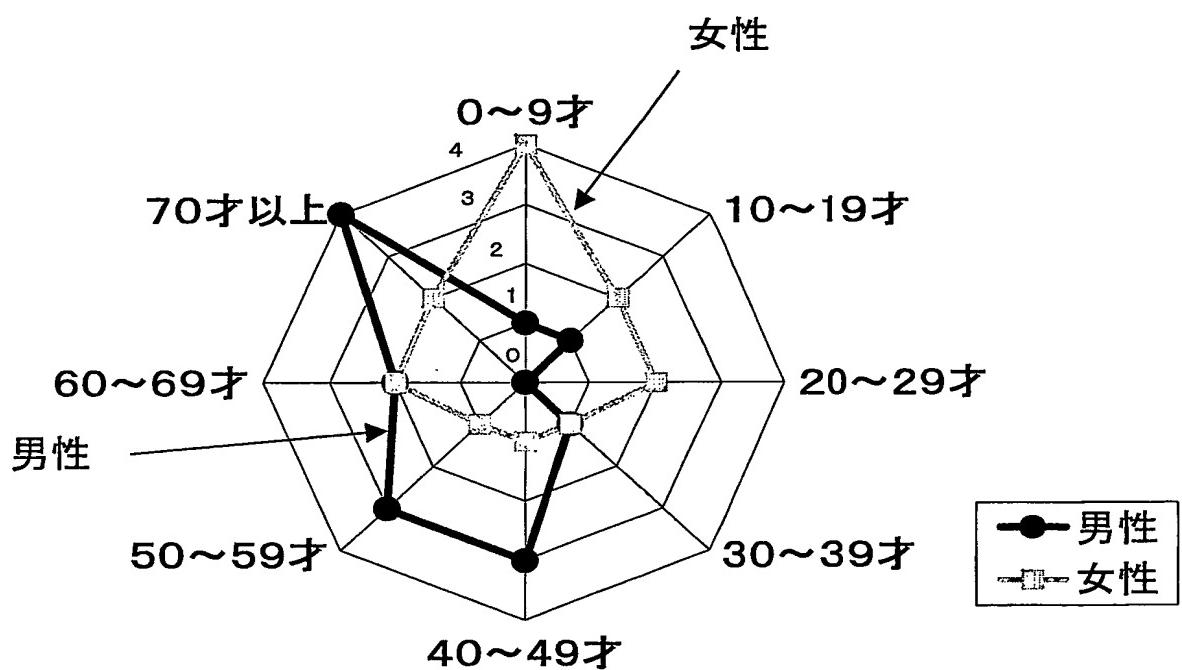
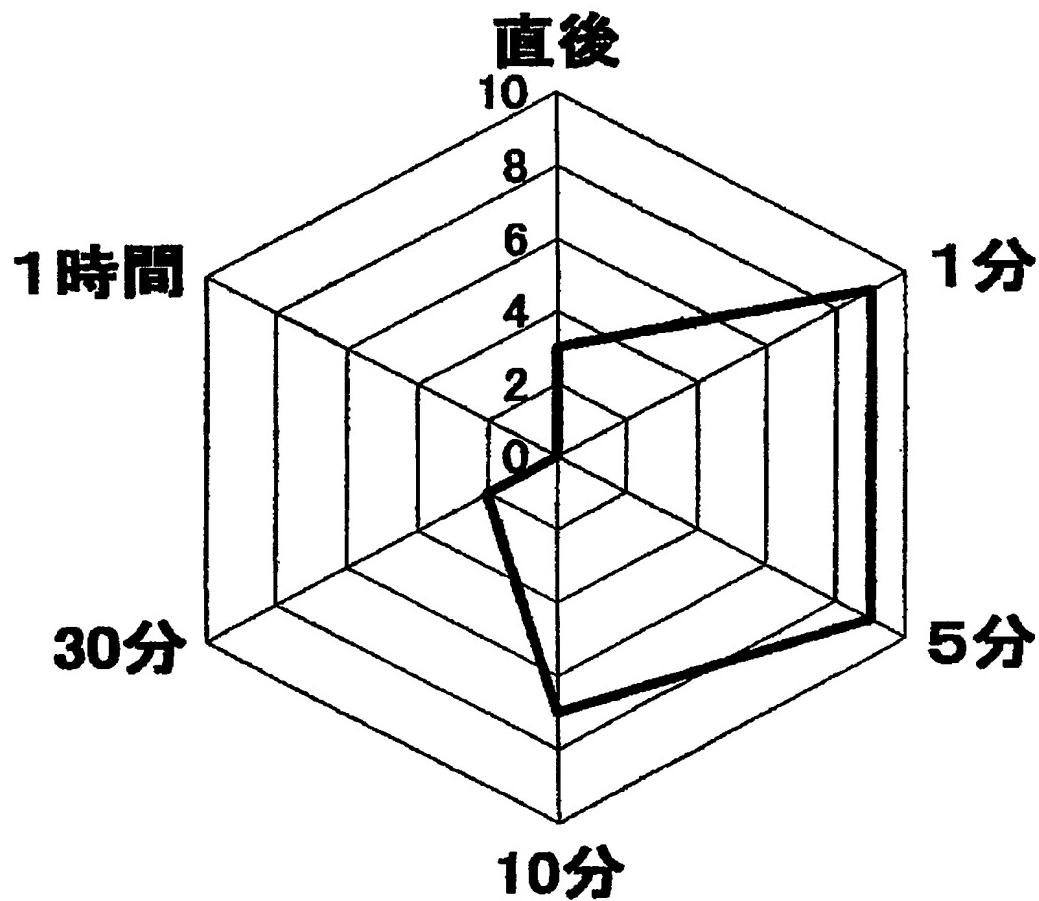


FIG. 4

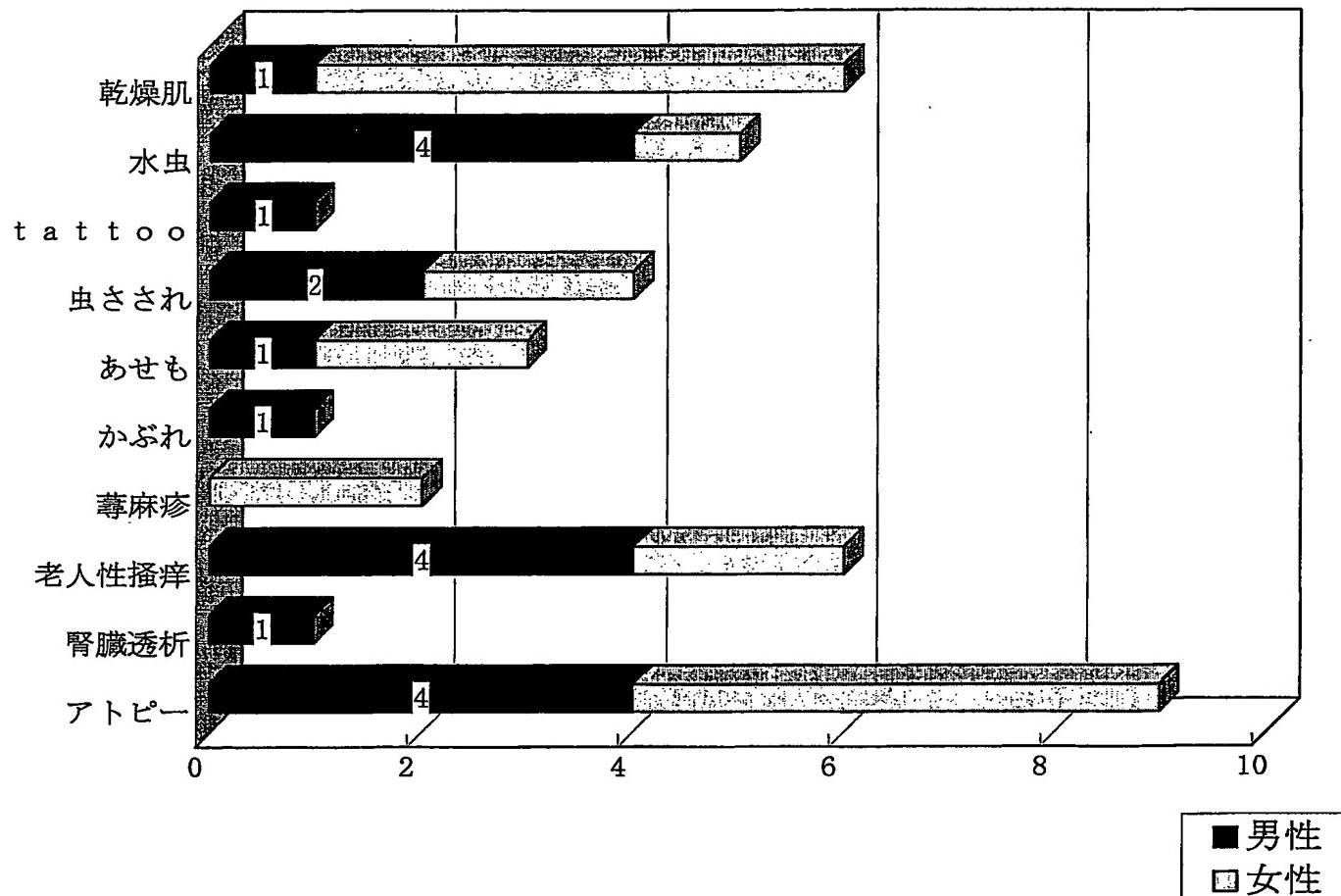
効果が現れるまでの時間



4 / 8

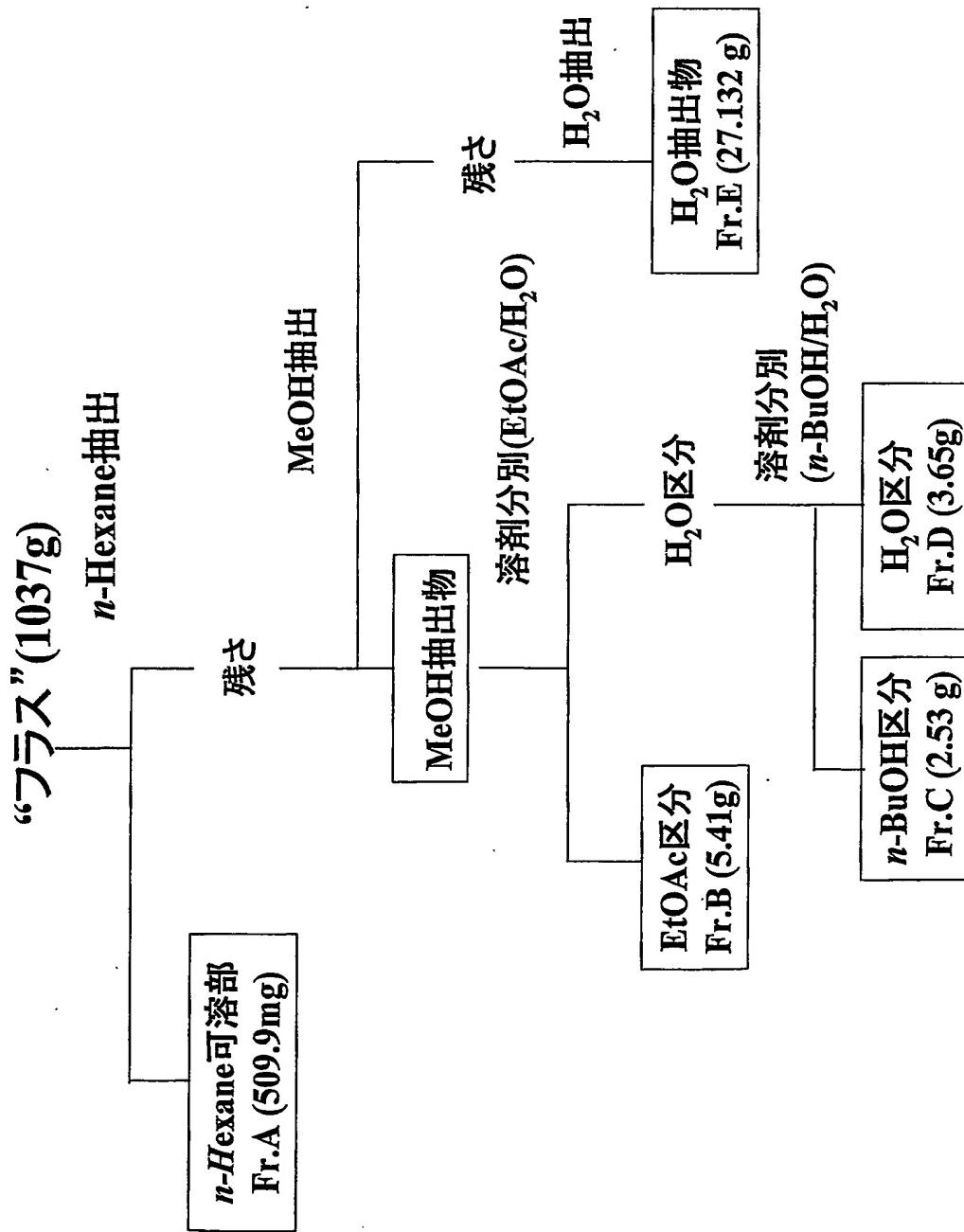
FIG. 5

症状 (男女別)



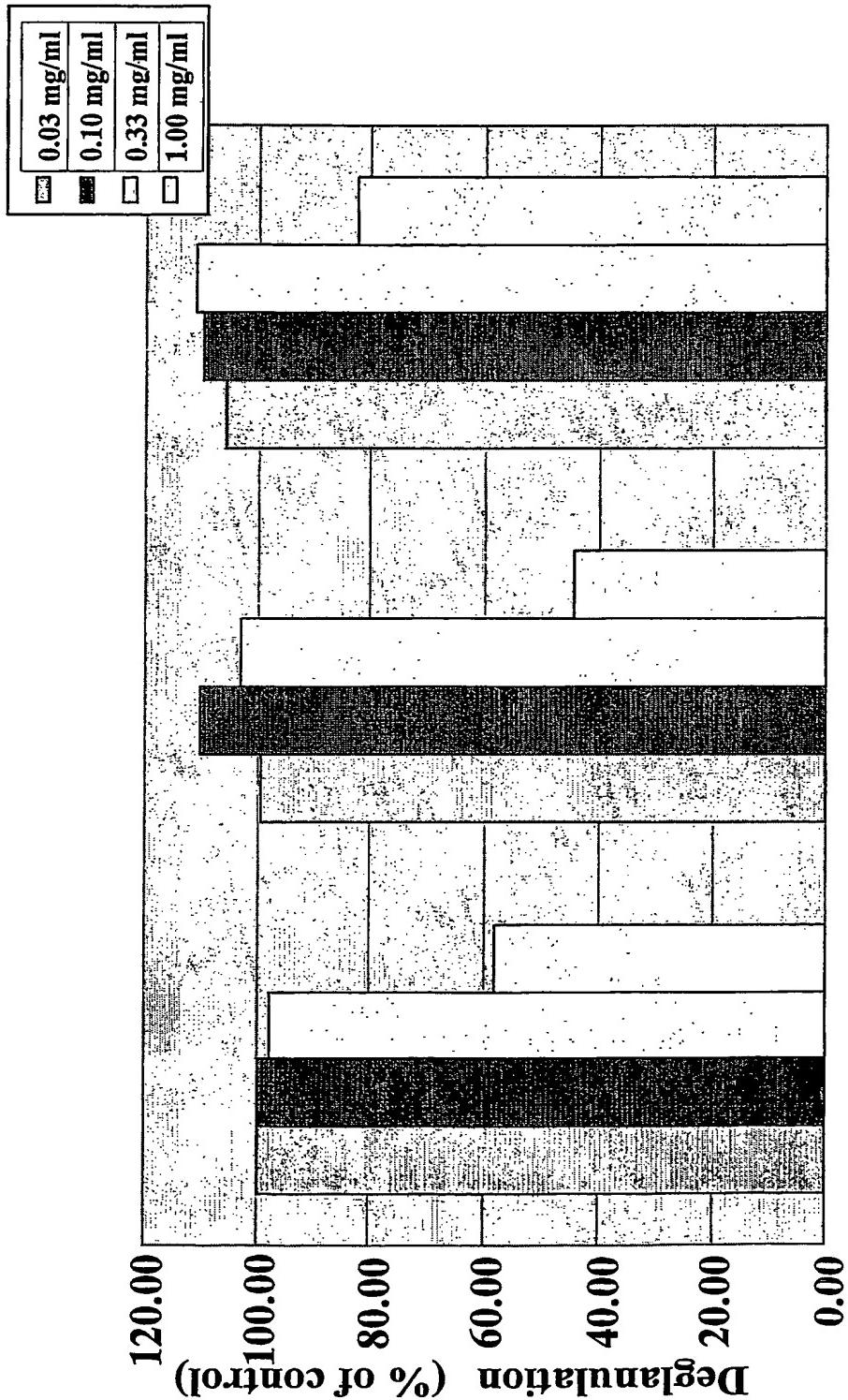
5/8

FIG. 6



6/8

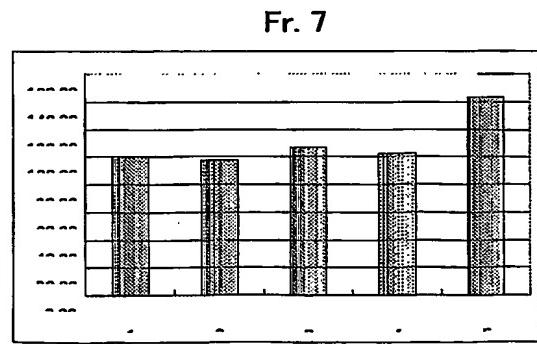
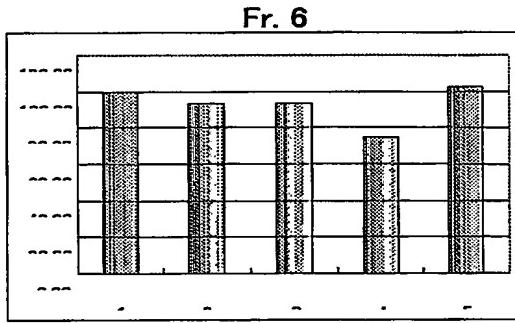
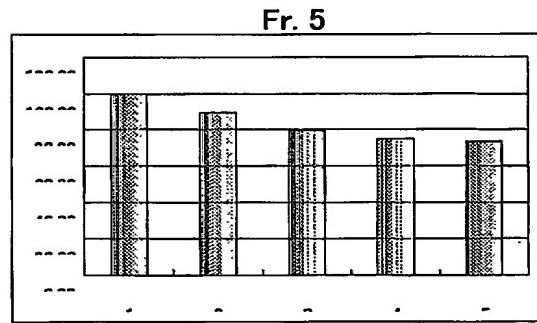
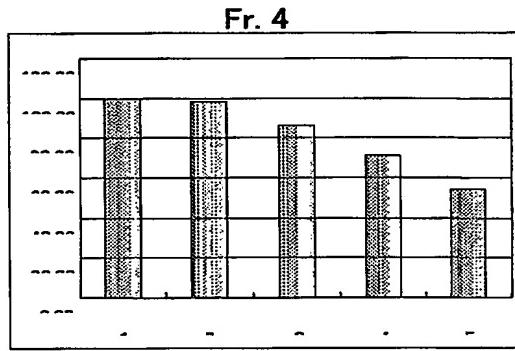
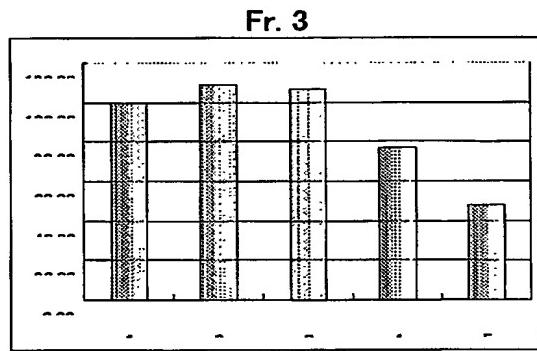
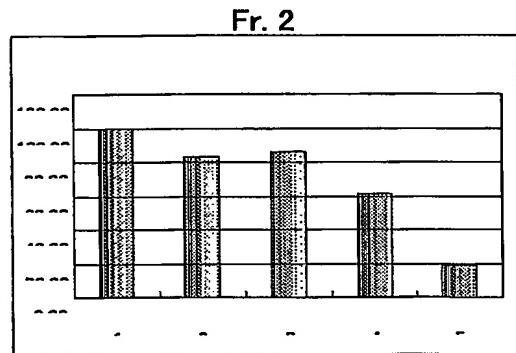
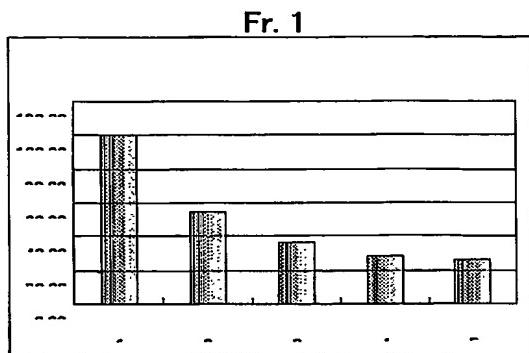
FIG. 7



達營之用紙(規則26)

7/8

FIG. 8

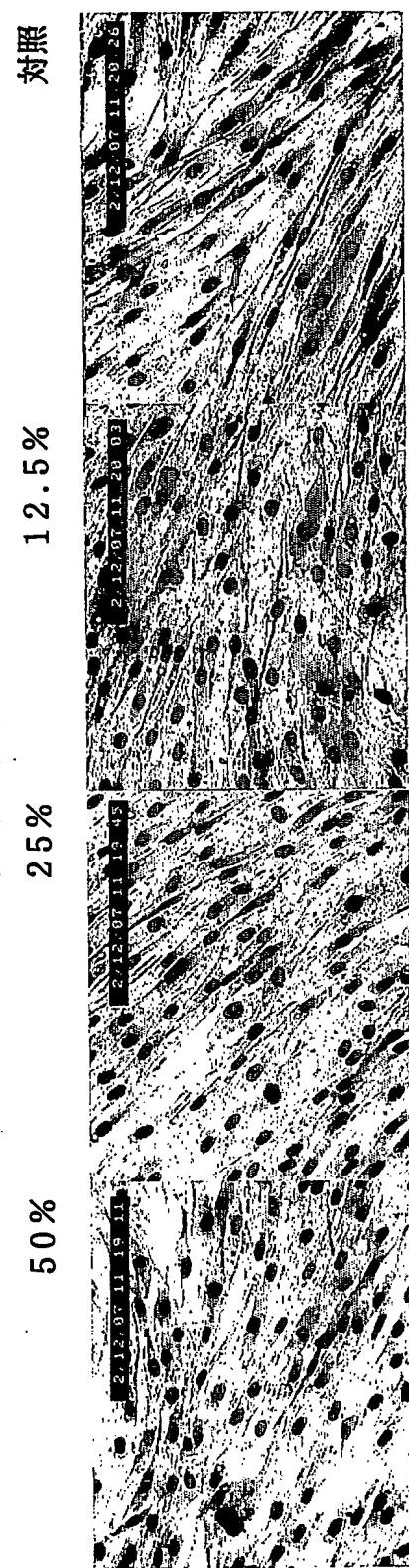


縦軸 Degranulation (% of control)

横軸 濃度

1 = DNP-BSA単独
2 = 0.03 mg/ml
3 = 0.1 mg/ml
4 = 0.33 mg/ml
5 = 1 mg/ml

FIG. 9



差替え用紙(規則26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/00287

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K35/64, A61K7/50, A61P17/00, A61P29/00, A61P37/08,
A61K9/08, A61K31/575//C07J9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K35/64, A61K7/50, A61P17/00, A61P29/00, A61P37/08,
A61K9/08, A61K31/575//C07J9/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN),
WPI (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Kaneyoshi AKAMATSU, "Shintei Wakan Yaku", Ishiyaku Pub., Inc., 15 October, 1980 (15.10.80), 1st edition, 5th print, page 948	1-5
A	JP 2000-333619 A (Nobuyuki IZENA), 05 December, 2000 (05.12.00), (Family: none)	1-5
A	JP 8-283292 A (Director General of National Institute of Sericultural and Entomological Science Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries), 29 October, 1996 (29.10.96), (Family: none)	1-5

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
25 February, 2003 (25.02.03)

Date of mailing of the international search report
11 March, 2003 (11.03.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP03/00287

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 8-283294 A (Director General of National Institute of Sericultural and Entomological Science Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries), 29 October, 1996 (29.10.96), (Family: none)	1-5
A	EP 136479 A1 (GANS E.), 10 April, 1985 (10.04.85), & JP 61-19 A & US 4623667 A	1-5
A	JP 60-146820 A (Yoshihisa KURIHARA), 02 August, 1985 (02.08.85), (Family: none)	1-5
A	JP 59-118702 A (Shiseido Co., Ltd.), 09 July, 1984 (09.07.84), (Family: none)	1-5
A	JP 48-23916 A (Kanebo Yamashiro Seiyaku Kabushiki Kaisha), 28 March, 1973 (28.03.73), (Family: none)	1-5
A	JP 6-100422 A (Pola Chemical Industries Inc.), 12 April, 1994 (12.04.94), (Family: none)	1-5
A	JP 148354 C1 (Ken ARAI), 19 February, 1942 (19.02.42), (Family: none)	1-5
A	Katsuhiro TAHATA et al., "Chikuzai Gaichu Benikamikiri no Seitai to Kagai", Shinrin Boeki, 1989, Vol.38, No.7, pages 121 to 125	1-5
A	Chem. abstr., Vol.88, the abstract No.71856, HIGGS, M.D. et al., 'Chemical mediators in the oviposition behavior of the house longhorn beetle, <i>Hylotrupes bajulus</i> .' Experientia, 1978, Vol.34, No.1, pages 46 to 47	1-5

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' A61K35/64, A61K7/50, A61P17/00, A61P29/00, A61P37/08, A61K9/08, A61K31/575 // C07J9/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' A61K35/64, A61K7/50, A61P17/00, A61P29/00, A61P37/08, A61K9/08, A61K31/575 // C07J9/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAP1us(STN), REGISTRY(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN),
EMBASE(STN), WPI(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	赤松金芳, 新訂 和漢薬, 医歯薬出版株式会社, 1980. 1 O. 15 第1版第5刷, p. 948	1-5
A	JP 2000-333619 A (伊是名信行) 2000.12.05 (ファミリーなし)	1-5

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.02.03

国際調査報告の発送日

11.03.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

大久保元浩

印

4C

8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	JP 8-283292 A (農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所長) 1996. 10. 29 (ファミリーなし)	1-5
A	JP 8-283294 A (農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所長) 1996. 10. 29 (ファミリーなし)	1-5
A	EP 136479 A1 (GANS E) 1985. 04. 10 & JP 61-19 A & US 46236 67 A	1-5
A	JP 60-146820 A (栗原栄寿) 1985. 08. 02 (ファミリーなし)	1-5
A	JP 59-118702 A (株式会社資生堂) 1984. 07. 09 (ファミリーなし)	1-5
A	JP 48-23916 A (カネボウヤマシロ製薬株式会社) 1973. 03. 28 (ファミリーなし)	1-5
A	JP 6-100422 A (ポーラ化成工業株式会社) 1994. 04. 12 (ファミリーなし)	1-5
A	JP 148354 C1 (新井謙) 1942. 02. 19 (ファミリーなし)	1-5
A	田畠勝洋他 「竹材害虫ベニカミキリの生態と加害」 森林防疫, 1 989, VOL. 38, No. 7, p. 121-125	1-5
A	Chem. abstr., vol. 88, the abstract No. 71856, HIGGS, M. D. et al. 1. 'Chemical mediators in the oviposition behavior of the house longhorn beetle, <i>Hylotrupes bajulus</i> .' Experientia, 1978, vol. 34, no. 1, p. 46-47	1-5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.